

## Área: Ciência de Alimentos

# IMPORTÂNCIA DA AMOSTRAGEM EM ANÁLISES LABORATORIAIS UTILIZANDO A DETERMINAÇÃO DE DEOXINIVALENOL EM TRIGO

**Andrieli Dallacort Cavalheiro\*, Linessa Salvador, Josemere Both, Caroline  
Balensiefer Vicenzi, Kelly Pelc, Luiz Carlos Gutkoski.**

*Laboratório de Cereais, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS*

*\*E-mail: [andrieli@msn.com](mailto:andrieli@msn.com); [101755@upf.br](mailto:101755@upf.br).*

**RESUMO** – Cereais e subprodutos de cereais como o trigo possuem papel fundamental na alimentação humana. O controle de qualidade do produto na compra e venda deve manter padrões aceitáveis para consumo humano, principalmente os níveis de contaminação por micotoxinas. A amostragem representa um ponto crítico deste controle na determinação da micotoxina deoxinivalenol (DON), devendo ser planejada, evitando que um lote contaminado seja aprovado para o processamento e elaboração de alimentos. Este estudo teve como objetivo investigar a influência da amostragem em lote de trigo para quantificação de DON, seguindo a IN nº 38, tendo como variação as quantidades de massa durante a amostragem. Para avaliar a influência, foi realizada a quantificação de DON através do Kit quantitativo Veratox® 5/5. Observou-se que a diminuição da massa na amostragem induz a erros de quantificação, pois menores valores de massa que preconizado na IN nº 38, apresentou varrições de 2600 a 1800µg/Kg na concentração de DON. Assim a amostragem é um fator determinante para que lotes sejam representativos em análises laboratoriais, prevenindo erros na comercialização de lotes contaminados com micotoxinas.

**Palavras-chave:** amostragem, trigo, deoxinivalenol.

## 1 INTRODUÇÃO

Cereais e subprodutos representam alimentos básicos na dieta humana (BRASIL, 2012). A produção de trigo representa 30% da produção global de grãos destinada à elaboração de produtos alimentícios (BRASIL, 2013) pela ampla possibilidade de gerar diversos alimentos a partir do seu refino (moagem), dando origem as matérias primas: farinha e farelo.

Os contaminantes em trigo, principalmente a presença de *Fusarium spp.*, causador da doença conhecida como giberela do trigo, representa grande preocupação por causar perda de produtividade em lavouras de trigo e por expor os grãos a contaminações por micotoxinas (MCMULLEN et al., 2012). No Brasil, a contaminação por micotoxinas em trigo para consumo humano pode conter um ou mais contaminantes do gênero, com a prevalência da Desoxinivalenol (DON) (DEL PONTE et al., 2015).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estipulou os Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, abrangendo as empresas de importação, produção, distribuição e comercialização de bebidas, alimentos e matérias primas em geral, através da RDC N° 7 DE 18 de fevereiro de 2011. O LMT para DON em trigo é 2000 µg/Kg.

Apesar das técnicas sofisticadas para determinação de DON, a distribuição heterogênea dos níveis de micotoxinas em lotes de cereais é um dos problemas enfrentados durante amostragem (EMBRAPA, 2005). No Brasil, a amostragem de trigo é regulamentada pela Instrução normativa IN n° 38 (BRASIL, 2010), que especifica o número de pontos de amostragem e a quantidade de amostras que devem ser destinadas ao laboratório para enquadramento de classe e tipo de trigo.

Alguns estudos demonstram que a amostragem é um fator preponderante nas determinações de micotoxinas e que pode induzir a erros de quantificação, produzindo resultados equivocados (WHITAKER et al. 2011; HALLIER et al., 2011; MALLMANN et al., 2013). Para assegurar que a amostra destinada a análise seja representativa, recomenda-se a utilização de planos de amostragem apropriados. Os planos de amostragem exibem grandes vantagens quando padronizados, segundo Mallmann e Dilkin, (2007) a amostragem de cereais para análise de micotoxinas deve seguir as seguintes etapas: coletas aleatórias de vários pontos do lote, a soma das coletas para formar uma amostra representativa; homogeneização e redução da amostra retirando-se uma alíquota final para quantificação em laboratório.

Este estudo teve como objetivo investigar a influência da amostragem em um lote de trigo para quantificação de Deoxinivalenol, seguindo a IN n° 38, tendo como variação a quantidade de massa durante a amostragem.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima:**

Para este estudo, foram utilizados grãos de trigo disponibilizado pelo Moinho Casquense, da cidade de Casca, RS, Brasil, a partir de uma análise prévia do banco de dados da empresa.

### **2.2 Amostragens para determinação de DON**

A amostragem padrão (Amostra n° 1) seguiu a IN n° 38, tendo como total do lote a quantidade de 40 toneladas de trigo, com 11 pontos de amostragem calados com calador manual, uniformemente distribuídos em meio de transporte rodoviário com profundidades que atingiram o terço superior, o meio e o terço inferior da carga a ser amostrada, na quantidade de 2 kg por coleta, totalizando 22 kg. A amostra foi submetida a quartejamento sequenciais até a obtenção de 2 kg, que foram reduzidos no laboratório a 0,5 kg para realização das análises.

A amostragem das demais amostras (2 a 11) foi retirada a partir de 500 kg de trigo, enquanto a carga era basculada do caminhão. O trigo foi colocado em 10 sacos de ráfia contendo 50 kg de amostra em cada. Foram

retirados 5 kg de cada saco em sequencia para que fossem formadas as sub amostras. Este procedimento foi realizado por dez vezes, reduzindo de forma proporcional o volume de cada saco. As sub amostras foram quarteada até a obtenção de 2,0 kg de trigo e diminuídas até 0,5 kg para análise em laboratório, como ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1. Representação da amostragem para determinação de DON.

Nº Amostra	Quantidade produto (kg)	Amostra para quarteamento (kg)	Amostra para análise (kg)
1 (Padrão)	40 000	2	0,500
2	500	2	0,500
3	450	2	0,500
4	400	2	0,500
5	350	2	0,500
6	300	2	0,500
7	250	2	0,500
8	200	2	0,500
9	150	2	0,500
10	100	2	0,500
11	50	2	0,500

### 2.3 Preparação das amostras

A moagem do trigo foi realizada em moinho experimental (modelo VG2000, Vitti Molinos, Brasil), obtendo-se as frações de farinha, farelino e farelo. A reincorporação das três frações compôs a farinha para quantificação de DON no grão de trigo.

O procedimento de extração da micotoxina foi realizado de acordo com o manual de instruções que acompanhava os kits utilizados (Veratox para DON 5/5, Neogen Corporation, USA) para determinação de DON. Para isto, diluiu-se 10 g de cada amostra em 100 mL de água destilada e agitou-se manualmente a suspensão por três minutos. A suspensão foi filtrada com o auxílio de papel filtro qualitativo nº 1, depositando o filtrado em béqueres previamente identificados conforme o número da amostra.

### 2.4 Quantificação de DON

As concentrações de DON foram determinadas utilizando kit de teste ELISA, conforme instruído pelo fabricante. Foi escolhido o Kit quantitativo Veratox® 5/5 (Neogen Corporation, USA), que é um teste imunoabsorvente ligado a enzimas competitivas diretas, com a faixa de detecção de 0,5 ppm a 5 ppm.

O kit contém uma placa de microtitulação com 12 micropoços revestidos com anticorpos, solução padrão contendo concentrações diferentes de micotoxinas (0 µg, 0,5 µg, 1,0 µg, 2,0 µg e 6,0 µg), conjugado de enzima, o antianticorpo, o substrato, uma solução de paragem e tampões de diluição.

Realizou-se a leitura dos resultados no espectrofotômetro (modelo 321Plus, Awareness Technology, INC.) a 650nm.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Amostragem é um parâmetro fundamental para a determinação de DON. Na Tabela 2 estão apresentados os valores de concentração de DON nas amostragens com as variações do LMT acima e abaixo do permitido pela legislação.

Tabela 2. Concentrações de DON em quantidades diferentes de massa de trigo e diferenças em relação ao LMT.

Amostra	Concentrações de DON (µg/kg)	Diferença em relação ao LMT (%)	Amostra	Concentrações de DON (µg/Kg)	Diferença em relação ao LMT (%)
1 Padrão	2600	+30	7	2100	+5
2	2200	+10	8	2300	+15
3	2400	+20	9	1900	-5
4	2600	+30	10	1900	-5
5	2200	+10	11	1800	-10
6	2400	+20			

LMT: Limite Máximo Tolerável. Valores positivos (+): acima do LMT. Valores negativos (-): abaixo/dentro do LMT.

Observa-se, que entre as amostras deste estudo, a quantidade reduzida ao final da quantificação de DON representa a diminuição de 94% da amostra representativa do lote. Segundo Whitaker (2003) um plano de amostragem baseado na quantificação de DON envolve os processos de amostragem, método de preparação e análise da amostra, demonstrando a variabilidade de cada etapa do procedimento, sendo apresentado como uma análise confiável e sensível para quantificação desta micotoxina.

Nota-se, que quando as amostragens foram alteradas a partir do padrão para menores massas, os valores de DON variaram demonstrando incoerência entre as amostras. Os valores encontrados, (amostras 1-8) quando comparado com a legislação vigente, estão acima dos limites permitidos pela legislação brasileira, que restringe a presença da toxina em níveis máximos de 2000 µg/Kg em trigo, não estando adequada para o consumo humano. A variação do LMT entre as amostras 1 a 11 foram de -10 a +30%, respectivamente. As amostras de 2 a 8 apresentaram valores acima (positivos) do LMT, aproximando-se da concentração real de DON no lote. A partir da amostra 9 a 11 os valores foram menores que o LMT, demonstrando que a amostragem com pequenas massas, derivadas de grandes lotes, não são representativas. Quando o tamanho da amostra é

menor que a representação verdadeira do lote, observa-se a diminuição da concentração de DON, enquadrando-se dentro dos limites estabelecidos. Estas diferenças entre as amostragens deixa clara a influência que a mesma tem em análises laboratoriais, promovendo equívocos e gerando grandes prejuízos comerciais e a saúde.

Conforme a tendência dos resultados apresentados, a amostragem pode ser uma fonte de erro grave e um fator decisivo na determinação de DON. Considerando-se que no lote pode haver focos de contaminação em partes diferentes, confirma-se a heterogeneidade dos grãos em lotes de cereais. As partículas contaminadas com micotoxinas podem estar em áreas delimitadas, não homogêneas no lote, sendo assim, se o plano amostral for realizado coletando amostras a partir de um único ponto do lote, as partículas contaminadas podem, ou não ser coletadas (MALLMANN & DILKIN, 2011) representando de forma errônea o lote, caracterizando-se um ponto crítico de controle na comercialização do trigo como matéria prima para consumo humano ou animal.

## **4 CONCLUSÃO**

A amostragem é um fator determinante para que lotes sejam representativos em análises laboratoriais, apresentando resultados confiáveis, prevenindo resultados falsos positivos, podendo impossibilitar a comercialização dos produtos gerando prejuízos econômicos para a indústria cerealista. Para a produção de alimentos seguros, faz-se necessário o monitoramento de níveis de contaminantes, envolvendo a etapa de amostragem adequada, atendendo a legislação vigente.

## **5 AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Moinho Casquense Ltda., por disponibilizar o material e o laboratório para as análises, aos colaboradores da moega por auxiliarem na coleta das amostras.

## **6 REFERÊNCIAS**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 38, de 30 de novembro de 2010. Regulamento Técnico do Trigo. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1mar. Seção 1, 2010.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de boas práticas nutricionais, 2012. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/.../Boas+praticas+nutricionais.pdf.>. Acesso em: 03 de agosto de 2012.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de coleta de amostras do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem vegetal / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, p. 37, 2011.

DELPONTE, E.M.; SPOLTI, P.; WARD, T.J.; GOMES, L.G.; NICOLLI, C.P.; KUHNEM, P.R.; SILVA, C.N.;

TESSMANN, D.J. Regional and Field-Specific Factors Affect the Composition of Fusarium Head Blight Pathogens in Subtropical No-Till Wheat Agroecosystem of Brazil. **Phytopathology**, v.105, n. 2, p. 246-254, 2015.

EMBRAPA. Principais contaminantes de trigo na fase de pós-colheita. Documentos on-line nº 105. 2005. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do105\\_4.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do105_4.htm)> Acesso em: 29 de junho de 2015.

HALLIER, A.; CELETTE, F.; DAVID, C. Effects of sampling and extraction on deoxynivalenol quantification. **Food Chemistry**, v. 127, p. 303–307, 2011.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. Micotoxinas e micotoxicoses em suínos. **Santa Maria: Sociedade Vicente Pallotti Editora**, p. 232, 2007.